

TREBALL DE FINAL DE GRAU

IMPLICACIÓ DELS microRNAs EN LA
REGULACIÓ DE L'ESPERMATOGÈNESI. NOUS
BIOMARCADORS DE FERTILITAT

Laura Gros Meca

Grau en Ciències Biomèdiques
Tutora: Dra. Ester Anton Martorell
Data d'entrega: 30/05/2018
Curs 2017-2018

Índex

Introducció.....	2
Objectiu.....	2
Metodologia.....	2
Resultats i discussió	2-14
Espermatogènesi.....	2,3
microRNAs.....	3-5
Regulació de l'espermatogènesi via miRNAs.....	5-10
Implicació dels miRNAs en la fertilitat masculina.....	10-14
Conclusió.....	14
Bibliografia.....	15,16

Introducció

La infertilitat es considera un problema de salut pública que afecta una gran part de les parelles en edat reproductiva. En molts casos és responsable el factor masculí.

Un correcte desenvolupament del procés d'espermatogènesi és essencial per la formació dels espermatozoides, i que aquests siguin capaços de fecundar l'òcit de manera eficient. A causa de la seva importància és un procés altament regulat. Entre els elements reguladors trobem els microRNAs, molècules de *small non-coding RNA* implicades en el control de l'expressió gènica. En els darrers anys s'ha demostrat la seva rellevància com a factors reguladors, i la seva implicació en la fertilitat masculina.

Existeixen gran nombre de casos d'infertilitat on fins ara no s'ha pogut definir el seu origen. Per això, sorgeix la necessitat d'establir nous mètodes de diagnòstic per tal de millorar els actuals, i que ens permetin explicar el perquè d'aquests casos.

Mitjançant diversos estudis s'observen diferències en el perfil d'expressió dels microRNAs entre els individus fèrtils i infèrtils, i entre els diferents individus infèrtils. Gràcies a aquestes evidències i el seu paper en la regulació de l'espermatogènesi, es proposen els microRNAs com a nous biomarcadors de fertilitat.

Objectiu

La infertilitat masculina és, doncs, un problema rellevant, i no sempre presenta una causa definida. Per aquest motiu, els objectius d'aquest treball són:

- Analitzar el patró d'expressió dels miRNAs descrits a la literatura durant les diferents fases de l'espermatogènesi, i la seva funció reguladora.
- Analitzar els diferents patrons d'expressió dels miRNAs descrits a la literatura en els diferents tipus de pacients infèrtils.
- Comprovar si hi ha una relació entre el patró de miRNAs dels diferents tipus de pacients infèrtils amb el patró expressat en les diferents fases de l'espermatogènesi, per tal de relacionar el moment en què es produeix l'alteració de formació dels gàmetes amb les característiques del pacient infèril, i poder així, entendre millor l'etiologia de la infertilitat.

Metodologia

Aquest treball es basa en realitzar una revisió bibliogràfica. Les principals fonts i bases de dades consultades són *PubMed- NCBI* i *Scopus* per la recerca d'articles científics, i la "Organització Mundial de la Salut" per consultar conceptes i dades estadístiques. La recerca es porta a terme des de novembre de 2017, fins a l'abril de 2018.

La cerca d'articles es realitza principalment en anglès, i les paraules clau utilitzades són: *infertility, male infertility, sperm cell, microRNAs, expression, spermatogenesis, regulation, biomarkers*.

Els articles seleccionats són revisions sistemàtiques, i articles experimentals. S' inclouen articles publicats des del 2008 fins l'actualitat.

Resultats i discussió

Espematogènesi

L'espermatogènesi és el procés de formació dels gàmetes masculins. Es produeix als túbuls seminífers situats a l'interior dels testicles.

L'epiteli dels túbuls està format per dos tipus cel·lulars, les cèl·lules germinals o espermatogonis, i les cèl·lules de Sertoli, que donen suport estructural i nutricional a les anteriors.

L'espermatogènesi permet la formació d'espermatozoides a partir dels espermatogonis, i consta de tres fases: **proliferativa, meiòtica, i espermiogènesis**.¹

Les cèl·lules germinals primordials es mantenen en fase G0 del cicle cel·lular fins al moment del naixement, on entren de nou al cicle cel·lular, i es converteixen en espermatogonis.² Aquests últims són cèl·lules mare diploides situades sobre la membrana basal de l'epiteli seminífer i envoltades per les cèl·lules de Sertoli. Presenten una divisió mitòtica, i són les encarregades de mantenir el *pool* de cèl·lules germinals. Podem diferenciar-ne tres tipus:

- Tipus Ad: cèl·lules de reserva amb baixa proliferació.
- Tipus A: divisió mitòtica mantenint constant el *pool* d'espermatogonis tipus A.
- Tipus B: divisió mitòtica donant lloc als espermatòcits primaris.

Aquesta primera fase es coneix com **fase proliferativa**.

A partir dels espermatòcits primaris derivats dels espermatogonis de tipus B s'inicia la **fase meiòtica**. Les cèl·lules experimenten la primera divisió meiòtica i donen lloc als espermatòcits secundaris. Aquests pateixen una segona divisió i apareixen les espermàtides. Gràcies a aquesta fase s'obtenen les cèl·lules haploides.

Finalment, es produeix la **fase d'espermiogènesis**. Les espermàtides es sotmeten a una sèrie de canvis, i donen lloc als espermatozoides. Aquesta fase consta de dues etapes, una primera en què es produeixen canvis morfològics (reducció del volum i pes cel·lular, formació del flagel i sistema acrosòmic), i es condensa el material genètic per garantir la seva protecció; i una segona anomenada **espermiació**, on els espermatozoides són alliberats de les cèl·lules de Sertoli, i es mouen per l'interior dels túbuls seminífers fins a arribar a la *rete testis*, i des d'allà es dirigeixen a l'epidídim, on es produeix la maduració espermàtica.

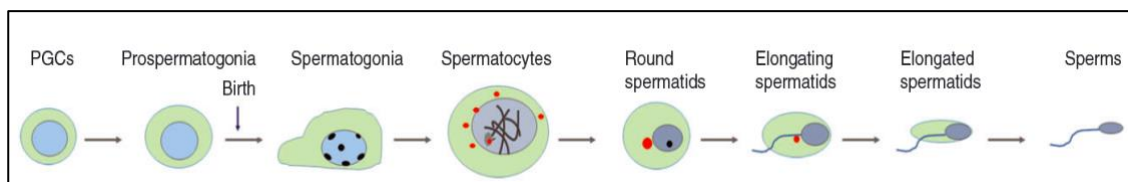


Figura 1. Estadis cel·lulars durant el procés de l'espermatogènesi.³

Durant aquest procés, a mesura que les cèl·lules proliferen avancen sobre l'epiteli, de manera que es considera que aquest està dividit en segments o onades segons les diferents etapes del cicle. Cada segment està format per l'associació d'un tipus cel·lular concret.

Al nounat només trobem cèl·lules de Sertoli que envolten els espermatogonis i els espermatòcits primaris, i quan l'individu assoleix la pubertat es reprèn el procés, que es manté durant la vida adulta de l'individu.¹ És un procés altament regulat, tant a nivell endocrí com molecular.

microRNAs

L'RNA d'interferència consta de molècules d' *small non- coding RNA* implicades en el control de l'expressió gènica. Actuen principalment a nivell post-transcripcional i traduccional.² Es poden

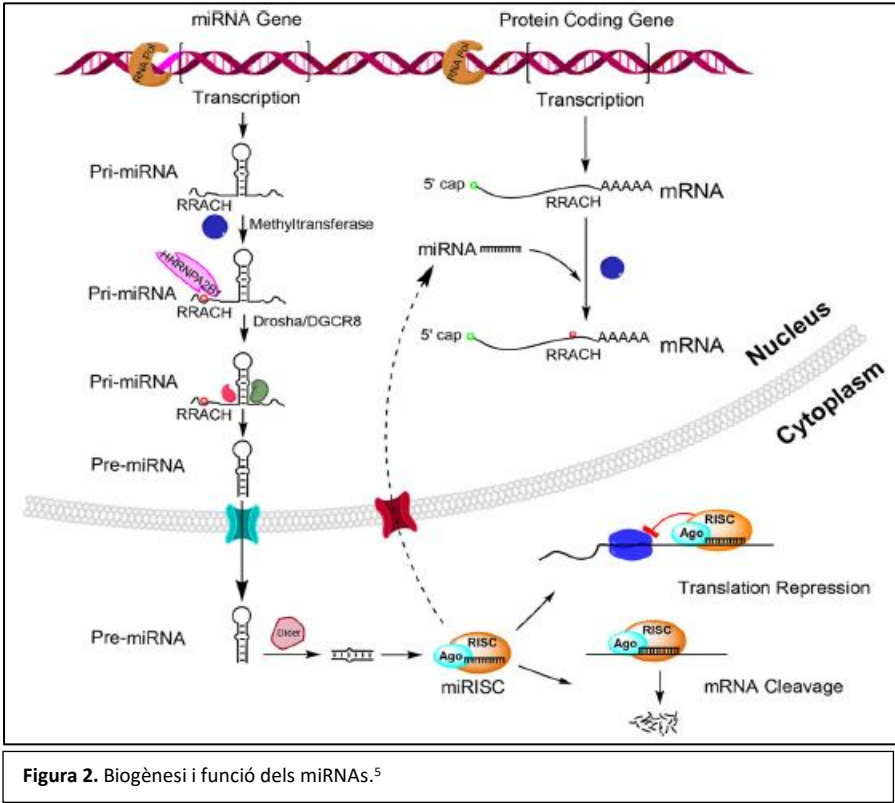
classificar en tres grups: *small interfering RNA* (siRNA), *microRNA* (miRNA), i *piwi- interacting RNA* (piRNA).⁴

Properties	siRNA	miRNA	piRNA
Length	~21 nt	~22 nt	~24–30 nt
Strand	Double-stranded RNA	Single-stranded RNA	Single-stranded RNA
Number	NA	Several hundred	~50 000
Origin	Exogenous RNA	Endogenous RNA	Endogenous RNA
Expression	Not expressed in tissues or cells	Various tissues and cells	Spermatocytes, spermatids
Binding targets	mRNA	Ago subclass	Piwi subclass
Dicer	Dicer required	Dicer required	Dicer independent
Function	mRNA degradation or posttranscriptional silencing	mRNA instability and translation inhibition	Repression of retrotransposon & post-transcriptional regulation

Taula 1. Comparació de les propietats dels siRNA, miRNA i piRNA.⁴

Els microRNAs es descobreixen per primera vegada a l'espècie *Caenorhabditis Elegans*. Són molècules de RNA monocadena formades per aproximadament 22 nucleòtids. El seu origen es troba al RNA endogen, la majoria localitzats a regions intròniques, i es considera que al voltant d'1% del genoma humà codifica per miRNAs.⁵ Regulen aproximadament un 30% dels gens.⁴

La síntesi de miRNAs s'inicia amb la transcripció del precursor de miRNA (pri-miRNA) per la RNA polimerasa II al nucli cel·lular. Es poden transcriure de forma que contenen un únic *hairpin* o clústers de múltiples *hairpins*. A continuació, la seqüència transcrita és metilada per l'enzim *metiltransferasa like 3*. Un cop metilat, el pri-miRNA és reconegut per DGCR8, cofactor de Drosha. Drosha és una ribonucleasa III (RNasa III), que actua tallant el pri-mRNA, i genera una molècula de 70 nucleòtids coneguda com pre-miRNA. El pre- miRNA és reconegut per l'exportina 5 i es transporta al citoplasma. Un cop aquí, actua de nou una RNasa III coneguda com a Dicer, i genera una molècula de doble cadena de 22 nucleòtids, és a dir, el miRNA madur. Finalment, una de les cadenes de miRNA s'uneix a la proteïna Argonauta formant el complex miRISC (*miRNA induced silencing complex*), i l'altra cadena es degrada (Figura 2).⁵



miRISC presenta activitat RNasa III, i és l'encarregat de regular l'expressió gènica mitjançant dues vies principals:⁵

- **Degradació del mRNA diana:** la cadena de RNA s'uneix a l'extrem 3'-UTR del seu RNA missatger (mRNA) diana, i indueix la seva degradació. La complementarietat entre miRNA i mRNA diana no és total, una molècula de miRNA pot induir la degradació de més d'un mRNA.
- **Inhibició de la traducció:** inhibint la traducció de manera directa, o bé actuant sobre m6- CAP.

Regulació de l'espermatogènesi via miRNAs

Per aconseguir uns gàmetes madurs capaços de fertilitzar l'òcit és necessari que el procés d'espermatogènesi es desenvolupi de manera eficient, pel que és un procés altament regulat. Un dels principals nivells de regulació és el control de l'expressió gènica, el que deriva en l'aparició de diferents perfils transcripcionals en funció del tipus i estadi cel·lular.

La major activitat transcripcional es troba als espermatoïcits primaris i disminueix al llarg del procés, fins a ser nul·la durant l'espermioïgenesis, quan es produeix l'empaquetament de la cromatina.⁶

Analitzant els *small non-coding RNAs* es detecta l'expressió de fins a 24.000 tipus diferents als espermatozoides masculins, sent els més estudiats els miRNAs.⁷ Els nivells més alts de miRNAs coincideixen amb la màxima activitat transcripcional.⁶

Presenten un paper important en la regulació gènica, i a la vegada es troben regulats per diferents mecanismes moleculars, de manera que s'expressen de forma diferencial al llarg del procés.

Inicialment, les cèl·lules germinals primordials presenten una elevada expressió dels clústers mir17-92, i mir290-295, i dels miR-141, miR-200a, miR-200c, i miR-323. L'expressió d'aquests últims disminueix a mesura que avança el desenvolupament, i l'expressió de la família Mir Let7 augmenta.³

A continuació es formen els espermatogonis, els quals són cèl·lules mare, de manera que és important que mantinguin un estat proliferatiu i indiferenciat per assegurar la producció continua d'espermatozoides.

Expressen el *Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor* (GDNF), i aquest, mitjançant diferents vies de senyalització intracel·lular estimula l'expressió de múltiples factors de transcripció, entre ells ETV5. Aquest últim és essencial per l'autorenovació cel·lular, ja que ratolins ETV5^{-/-} presenten una pèrdua completa de les cèl·lules germinals.⁸

ETV5 actua estimulando l'expressió de varis miRNAs que presenten al seu promotor múltiples llocs d'unió per aquest factor, entre ells miR-21. Aquest miRNA és important per la supervivència dels espermatogonis, i actua regulant el procés d'apoptosis. La seva inhibició incrementa el nombre de cèl·lules apoptòtiques (Figura 3).⁸

Per tant, el procés de proliferació cel·lular està regulat pel factor GDNF, que actua via ETV5 i diferents miRNAs, entre ells miR-21, mantenint la renovació i producció d'espermatozoides.

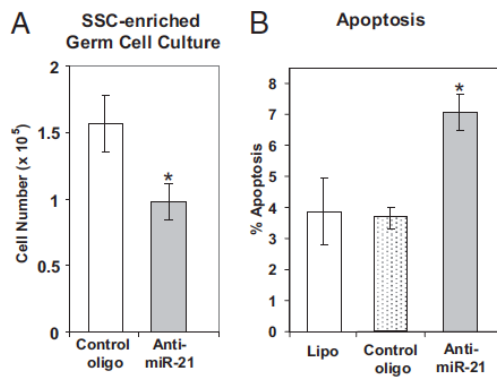


Figura 3. Funció de miR-21 en les cèl·lules germinals en cultiu. (A) El nombre de cèl·lules en cultiu transfectades amb Anti- miR-21 és inferior al nombre de cèl·lules transfectades amb un oligonucleòtid control. (B) Les cèl·lules transfectades amb un oligonucleòtid Anti- miR-21 presenten un índex apoptòtic superior a les cèl·lules transfectades amb un oligonucleòtid control.⁸

Per conèixer com es mantenen les cèl·lules en estat indiferenciat és important l'estudi de la proteïna KIT. S'utilitza com un marcador de diferenciació cel·lular. Les cèl·lules indiferenciades són KIT negatives, mentre que la seva expressió induïx la diferenciació.

Les cèl·lules germinals primordials són KIT positives, els espermatogonis són KIT negatius, i quan s'indueix la seva diferenciació es recupera l'expressió del factor.

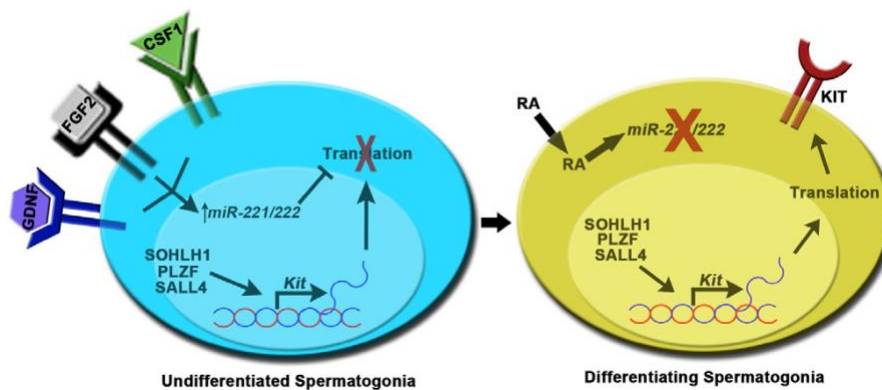


Figura 4. Control de l'expressió del gen *Kit*⁹

La transcripció del gen *Kit* es troba regulada per tres factors de transcripció.⁹ SOHLH1 estimula la transcripció del gen, i PLZF la inhibeix. Per altra banda, SALL4 recluta PLZF1, de manera que SOHLH1 es pot unir al promotor i estimular la transcripció de *Kit*.

Els tres factors de transcripció s'expressen tant a les cèl·lules indiferenciades com a les cèl·lules diferenciades, per tant en tots dos casos hi ha transcripció del gen *Kit*. La proteïna KIT, però, no s'expressa a les cèl·lules indiferenciades, per tant, hi ha una regulació a nivell post-transcripcional. L'encarregat d'aquesta regulació és el miR-221/222.⁹

miR-221/222 s'expressa a les cèl·lules indiferenciades. Té com a funció principal inhibir l'expressió de la proteïna KIT, i mantenir aquest estat indiferenciat. La seva expressió ve regulada per factors extrínsecs. GDNF, FGF2 i CSF-1 estimulen la seva expressió i per tant induïxen un estat cel·lular indiferenciat, mentre que l'àcid retinoic disminueix la seva expressió i promou la diferenciació estimulants l'expressió de KIT.⁹

La inhibició de miR-221/222 dona lloc a una pèrdua de l'estat indiferenciat, i les cèl·lules perdrien la funció de cèl·lula mare. En cap cas, però, es veu una disminució del nombre de cèl·lules com succeïa amb la inhibició de miR-21.

Per contra, una sobreexpressió de miR-221/222 inhibeix l'acció de l'àcid retinoic, i els espermatogonis mai assolirien un estat diferenciat.⁹

El clúster miR-17-92 també actua mantenint les cèl·lules en un estat indiferenciat, doncs inhibeix l'expressió de gens implicats en la diferenciació cel·lular com *Kit*, *Socs3* o *Stat3*.¹⁰ D'altra banda, inhibeix l'expressió de gens que indueixen l'apoptosi com *Bcl2*. Aquest últim fet és important, ja que no tots els espermatogonis entren en meiosi, sinó que ho fan un nombre reduït. Això és degut a que les cèl·lules de Sertoli només poden nodrir de forma eficient un determinat nombre de cèl·lules, per tant cal regular constantment el *pool* de cèl·lules presents.¹¹

Inhibint l'expressió d'aquest clúster s'observa un augment en l'expressió de miR-106b-25. Aquest últim actua compensant l'actuació de miR-17-92, ja que no s'observen canvis en l'expressió dels gens diana (Figura 5). Els dos miRNAs actuen de forma complementària mantenint un estat cel·lular indiferenciat.¹⁰

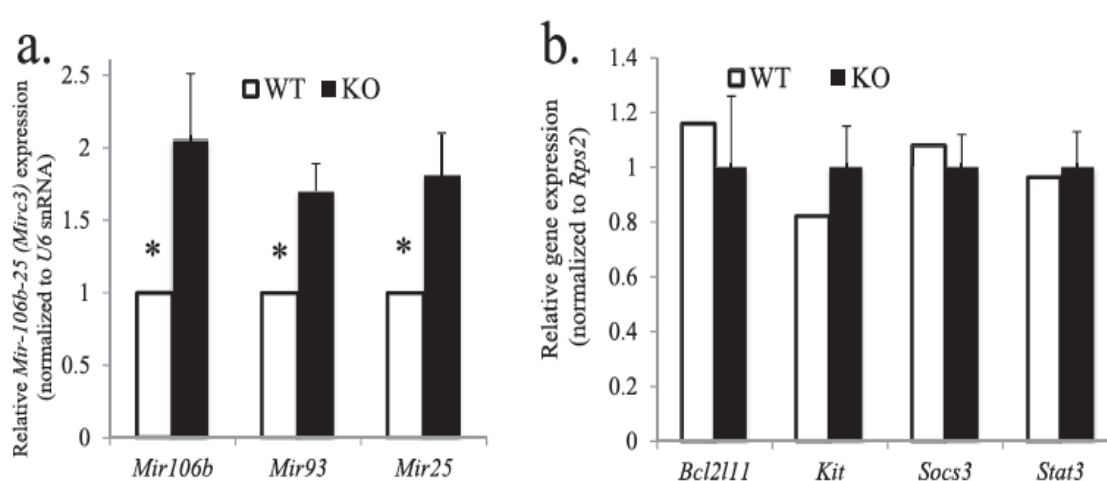


Figura 5. Anàlisi de l'expressió del clúster Mir-106b-25, i gens de diferenciació mitjançant RT-PCR quantitativa. (A) S'observa un augment significatiu de l'expressió de Mir-106b-25 en animals KO per miR-17-92. **(B)** No hi ha diferències significatives en l'expressió dels gens diana de miR-17-92 entre els animals WT i KO. ¹⁰

A mesura que avança el desenvolupament els espermatogonis indiferenciats perden la funció de cèl·lules mare i assoleixen un estat diferenciat. Aquesta transició ve regulada per l'àcid retinoic.

miR-146 s'expressa als espermatogonis indiferenciats i actua inhibint els gens de diferenciació cel·lular.¹² Davant l'estímul de l'àcid retinoic disminueix la seva expressió, i augmenta la dels gens de diferenciació. Encara no es coneix el mecanisme implicat en aquest efecte.

Per altra banda, miR-146 regula l'efecte de l'àcid retinoic. Les cèl·lules que sobreexpressen miR-146 no responen a l'àcid retinoic, pel que és capaç d'inhibir aquest senyal.¹²

S'estableix la hipòtesi que miR-146 regula l'expressió de MED1.¹² MED1 és un factor de transcripció que regula l'expressió dels receptors nuclears, entre ells el receptor de l'àcid retinoic. miR-146 inhibiria l'expressió de MED1, conseqüentment disminuiria la transcripció dels receptors nuclears, i les cèl·lules no podrien respondre als senyals de diferenciació rebuts de l'entorn.

Quan les cèl·lules es diferencien s'observa un canvi en el perfil d'expressió dels miRNAs. Als espermatogonis diferenciats, i espermatòcits primaris és important l'expressió de la família Mir Let7.

Mir Let7 actua inhibint l'expressió dels gens de proliferació cel·lular, i activa els gens de diferenciació.¹³ La seva expressió és induïda per l'acció de l'àcid retinoic. En aquest cas sí que es coneix el mecanisme d'actuació, i implica la participació del factor LIN28.

LIN28 és una *RNA binding protein* expressada a les cèl·lules germinals primordials, i cèl·lules indiferenciades. Actua unint-se al pri-mRNA de Mir Let7, i impedeix el processament per part de Dicer i Drosha, de manera que no es forma el miRNA.

L'expressió gènica de LIN28 també és regulada per l'àcid retinoic. Conté una seqüència RAREs (elements de resposta als receptors d'àcid retinoic) on s'uneixen els receptors RAR/RXR heterodimerics, i amb l'arribada de l'àcid retinoic inhibeixen l'expressió del gen.

Destacar que també es produeix una interacció directa entre Mir Let7 i LIN28. El mRNA de LIN28 és mRNA diana de Mir Let7. Per tant, davant l'estímul de l'àcid retinoic s'inhibeix l'expressió de LIN28 i augmenta la de Mir Let7, i aquest a la vegada potencia la seva expressió inhibint LIN28.¹³

Un altre miRNA encarregat de promoure la diferenciació cel·lular és miR-34c. La seva expressió és específica de cèl·lules germinals (Figura 6). S'expressa als espermatòcits, i espermatòides rodones.¹⁴

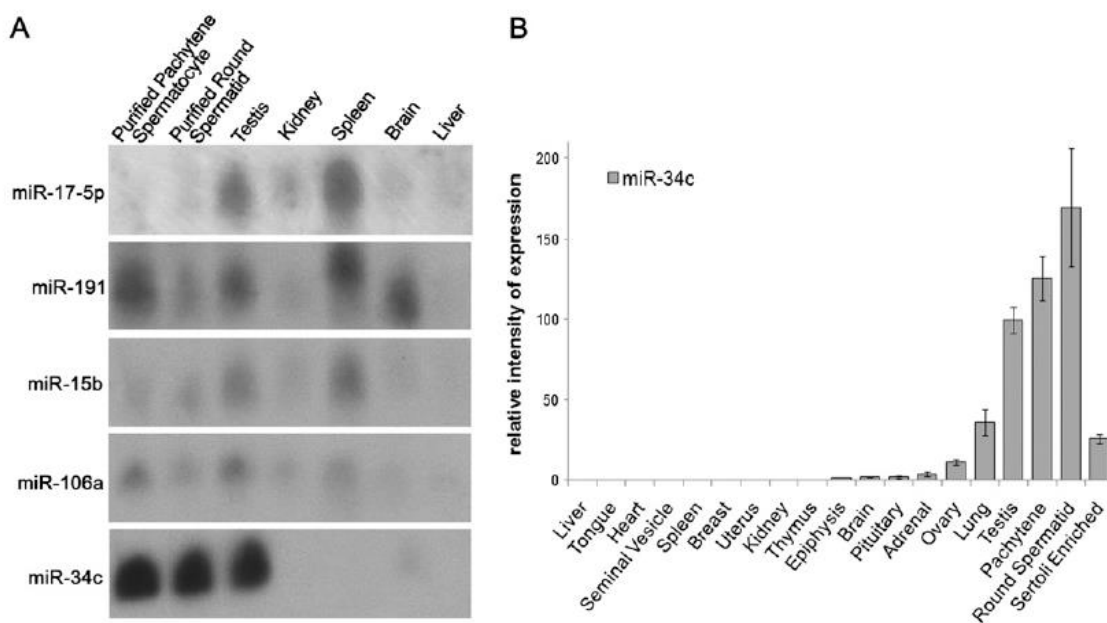


Figura 6. Expressió miR-34c en funció del teixit. (A) Els resultats del Northern Blot mostren una expressió específica de miR-34c als espermatòcits, espermatòides rodones, i testicles. (B) RT-qPCR mostra l'expressió de miR-34c en diferents teixits.¹⁴

Per promoure la diferenciació cel·lular miR-34c interacciona amb diferents vies de senyalització. La via de senyalització NOTCH consta de diferents factors, entre ells Notch2, que inhibeixen la diferenciació cel·lular, i estimulen la capacitat d'autorenovació de les cèl·lules. miR-34c actua

potenciant la degradació del mRNA de *Notch2*, i d'aquesta manera inhibeix els senyals que impedeixen la diferenciació.¹⁴

També actua sobre el factor *Nano2*. Es tracta d'una ribonucleoproteïna de la via de senyalització NANO, que actua inhibint l'expressió de gens inductors de la meïosi, entre ells *Stra8*. *miR-34c* promou la degradació de *Nano2*, i permet l'expressió de *Stra8*.¹⁵ Així la cèl·lula adquireix la capacitat d'entrar en meïosi.

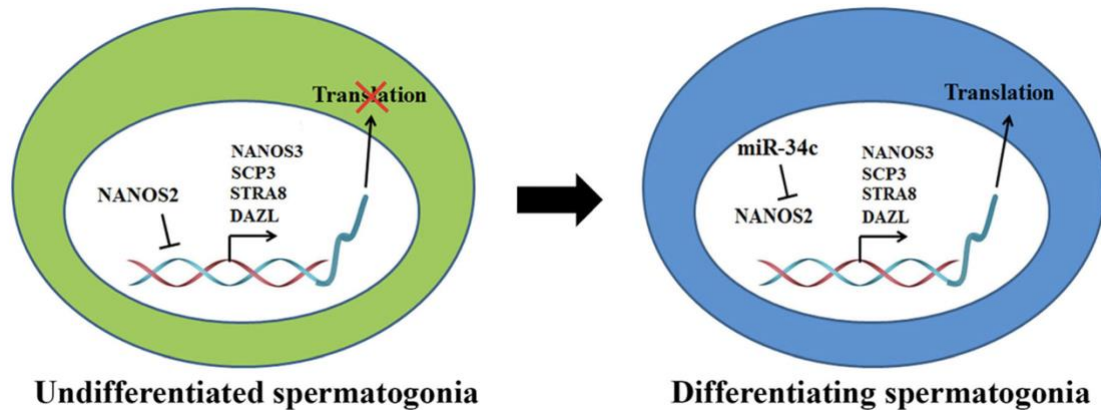


Figura 7. Procés de diferenciació cel·lular¹⁵

miR-34c també estimula la via intrínseca de l'apoptosi augmentant la *ratio Bcl2/Bax* mitjançant la inhibició d'ATF1. Aquest factor actua disminuint la *ratio Bcl2/Bax* de forma que indueix la supervivència de la cèl·lula.¹⁶

Durant la fase d'espermioogènesis es produeix la compactació de la cromatina. Les histones són substituïdes per les proteïnes de transició (TP1 i TP2), i posteriorment per protamines (Prm1 i Prm2). El mRNA d'aquestes molècules es transcriu a les espermatides rodones, però no s'expressa fins a assolir l'estadi d'espermàtides elongades. Es coneixen dos miRNAs implicats en aquesta regulació, són *miR-469* i *miR-122*.

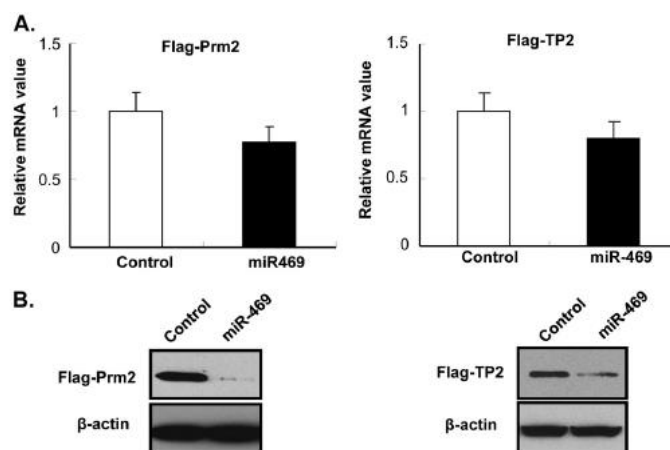


Figura 8. Repressió de Prm2 i TP2 via *miR-469*. (A) L'anàlisi per qPCR mostra la disminució dels nivells de mRNA de Prm2 i TP2 en presència de *miR-469*. (B) Mitjançant un Western Blott s'observa una expressió disminuïda del mRNA Prm2 i TP2 en les cèl·lules que presenten *miR-469* en comparació amb el control.¹⁸

miR-469 i miR-122 s'expressen a les espermàtides rodones. miR-469 actua inhibint la traducció de TP2, i Prm2, i miR-122 indueix la degradació del mRNA de TP2.^{17,18} Així s'aconsegueix limitar l'expressió d'aquestes proteïnes als últims estadis de l'espermioïgenesis. Es coneix que miR-469 està regulat per la *Gonadotropin-regulated Testicular RNA Helicase* (GTRH), concretament actua inhibint la seva expressió.¹⁸

A les espermàtides elongades disminueixen els nivells de miR-469 i miR-122 i es poden expressar les proteïnes de transició i les protamines, donant lloc a la compactació de la cromatina.

Finalment es formen els gàmetes madurs. Els espermatozoides no són només un reservori de DNA, sinó que també és important el conjunt de RNAs que contenen. S'observa un perfil de miRNAs específic. La majoria d'aquests no presenten la seva diana al mateix espermatozoide, sinó que es troba en l'òcit, de manera que actuen regulant alguns dels processos postfecundació. L'alteració d'aquest perfil de miRNAs pot derivar a casos d'infertilitat masculina.

Tots aquests resultats s'han observat en ratolins. Es considera que les seqüències de miRNAs estan altament conservades entre espècies, pel que els resultats serien extrapolables als humans.⁴

Implicació dels miRNAs en la fertilitat masculina

La infertilitat és una malaltia del sistema reproductor definida per l'Organització Mundial de la Salut (OMS) com la **incapacitat d'assolir un embaràs clínic després de 12 mesos o més de relacions sexuals no protegides**.¹⁹

Afecta 1 de cada 6 parelles en edat reproductiva i té una tendència creixent. Entre els diferents factors causals trobem l'alteració de la producció dels gàmetes, alteracions que dificulten el contacte entre aquests, i alteracions de la implantació. **El factor masculí és el responsable únic en el 25-35% dels casos**.²⁰

La infertilitat masculina presenta múltiples orígens. Per establir un bon diagnòstic cal realitzar una història clínica, un examen físic, i una sèrie de proves específiques. En molts casos, el resultat d'aquestes proves és normal i no s'arriba a definir una causa concreta. És l'anomenada **infertilitat idiopàtica**. A causa de l'elevat nombre de casos que queden sense resoldre amb els mètodes de diagnòstic actuals sorgeix la necessitat d'establir nous biomarcadors.

Un biomarcador és una molècula biològica present a la sang o altres fluids corporals que indica una funció fisiològica.⁷ Presenta una mesura objectiva, és fàcil de detectar, amb una alta sensibilitat i especificitat, i la seva detecció implica efectes secundaris mínims.

Actualment, pel diagnòstic de la infertilitat l'anàlisi de biomarcadors més utilitzat és l'anàlisi del semen o seminograma. Consisteix en un anàlisi macroscòpic, en què s'avalua el volum, color, viscositat, coagulació i pH de la mostra; i un anàlisi microscòpic on es detalla el nombre d'espermatozoides, la seva concentració, l'aglutinació de la mostra, la viabilitat, la morfologia i la motilitat.²¹

Tot i ser el seminograma la mostra més estandarditzada en el diagnòstic de la infertilitat, es creu que les propietats del semen no són les millors característiques per analitzar. Això és conseqüència del seu origen divers, i a què es pot veure alterat per molts factors externs.⁷

És per aquest motiu, i pel desenvolupament de noves tecnologies que apareixen nous biomarcadors. Els més destacats són biomarcadors genòmics, proteòmics, i metabòlics.⁷

Darrerament es considera l'ús dels miRNAs com a nou biomarcador de fertilitat. Aquestes molècules estan presents tant a les cèl·lules com als fluids corporals, com és el semen, pel que es podrien obtenir d'una forma no invasiva.

Estudis realitzats en pacients infèrtils han demostrat un patró d'expressió diferencial entre els pacients fèrtils i infèrtils, i entre les diferents classes d'infertilitat.²²⁻²⁵ Segons el centre i/o població on es realitza l'estudi, el perfil en una mateixa classe d'infertilitat és diferent. Això pot ser degut a la variabilitat interindividual i entre poblacions, i la sensibilitat del mètode utilitzat.²⁶

Entre els diferents estudis publicats, un estudi de la Universitat de Saarland- Alemanya analitza el perfil d'expressió dels miRNAs en individus normozoospermics, astenozoospermics, i oligoastenozoospermics.²⁵ Ens centrem en la revisió d'aquest estudi ja que permet la comparació entre els individus infèrtils i individus fèrtils, però també entre diferents classes d'infertilitat.

El protocol que porten a terme consisteix en l'obtenció de les mostres de semen i aïllament dels espermatozoides. Posteriorment es fa una purificació del RNA, i mitjançant un *microarray* s'obté el perfil d'expressió. Per tal de confirmar la presència dels miRNAs es fa una PCR.

Els resultats obtinguts mostren diferències significatives entre el perfil d'expressió dels miRNAs dels individus fèrtils comparat amb els individus astenozoospermics i entre els normozoospermics i oligoastenozoospermics (Taula 2).

Perfil d'expressió miRNAs			
Individus astenozoospermics vs. normozoospermics		Individus oligoastenozoospermics vs. normozoospermics	
Up regulats	Down regulats	Up regulats	Down regulats
hsa-let-7d hsa-let-7e hsa-let-7f hsa-miR-103 hsa-miR-125a-5p hsa-miR-1274a hsa-miR-130b hsa-miR-141 hsa-miR-146a hsa-miR-148a hsa-miR-151-3p hsa-miR-17 hsa-miR-185 hsa-miR-193a-3p hsa-miR-193b hsa-miR-200a hsa-miR-200b hsa-miR-20b hsa-miR-210 hsa-miR-22 hsa-miR-23b hsa-miR-24 hsa-miR-26a hsa-miR-26b hsa-miR-27a	hsa-miR-122 hsa-miR-1231 hsa-miR-127-3p hsa-miR-1281 hsa-miR-1299 hsa-miR-1470 hsa-miR-1825 hsa-miR-1973 hsa-miR-2861 hsa-miR-3154 hsa-miR-33b* hsa-miR-34b hsa-miR-3613-3p hsa-miR-3614-5p hsa-miR-3679-5p hsa-miR-3682 hsa-miR-3917 hsa-miR-4290 hsa-miR-4298 hsa-miR-4312 hsa-miR-4313 hsa-miR-550a hsa-miR-572 hsa-miR-575 hsa-miR-638	hsa-let-7b hsa-let-7c hsa-let-7d hsa-miR-125a-5p hsa-miR-139-3p hsa-miR-141 hsa-miR-148a hsa-miR-187* hsa-miR-193a-3p hsa-miR-193a-5p hsa-miR-193b hsa-miR-200a hsa-miR-200b hsa-miR-200c hsa-miR-205 hsa-miR-23b hsa-miR-24 hsa-miR-26a hsa-miR-27b hsa-miR-29a hsa-miR-29b hsa-miR-29c hsa-miR-30d hsa-miR-30e hsa-miR-320d	hsa-miR-122 hsa-miR-122* hsa-miR-1228* hsa-miR-127-3p hsa-miR-1306 hsa-miR-132 hsa-miR-150 hsa-miR-15a hsa-miR-15b hsa-miR-16 hsa-miR-192 hsa-miR-1973 hsa-miR-19a hsa-miR-205* hsa-miR-206 hsa-miR-20a hsa-miR-2115* hsa-miR-25 hsa-miR-29b-2* hsa-miR-3149 hsa-miR-3154 hsa-miR-335 hsa-miR-34b* hsa-miR-34c-5p hsa-miR-3609

hsa-miR-27b	hsa-miR-671-5p	hsa-miR-320e	hsa-miR-3679-5p
hsa-miR-29a	hsa-miR-939	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-425
hsa-miR-29b		hsa-miR-361-5p	hsa-miR-4284
hsa-miR-29c		hsa-miR-363	hsa-miR-4298
hsa-miR-30a		hsa-miR-373*	hsa-miR-4299
hsa-miR-30d		hsa-miR-374a	hsa-miR-449a
hsa-miR-30e		hsa-miR-374b	hsa-miR-449b
hsa-miR-3159		hsa-miR-375	hsa-miR-499-5p
hsa-miR-320b		hsa-miR-429	hsa-miR-513a-5p
hsa-miR-320e		hsa-miR-520b	hsa-miR-518e
hsa-miR-324-5p		hsa-miR-520e	hsa-miR-520a-5p
hsa-miR-331-3p		hsa-miR-762	hsa-miR-520h
hsa-miR-361-3p		hsa-miR-769-3p	hsa-miR-574-5p
hsa-miR-361-5p		hsa-miR-891a	hsa-miR-590-5p
hsa-miR-363		hsa-miR-98	hsa-miR-595
hsa-miR-374a		hsa-miR-99a	hsa-miR-625
hsa-miR-374b		hsa-miR-99b	hsa-miR-873
hsa-miR-4286			hsa-miR-9*
hsa-miR-429			
hsa-miR-4324			
hsa-miR-497			
hsa-miR-520b			
hsa-miR-92a			
hsa-miR-98			
hsa-miR-99a			

Taula 2. Diferències en el perfil d'expressió dels individus astenozoospermics, i oligoastenozoospermics en comparació amb els individus normozoospermics. ²⁵

Els individus astenozoospermics presenten diferències amb els individus fèrtils pel que fa a la morfologia i motilitat dels espermatozoides. Entre els diferents miRNAs alterats es coneix que Mir-let7, miR-30d, miR-22, i miR-320b estan relacionats amb la morfologia cel·lular, mentre que Mir-let7, miR-15 i miR-520b amb la motilitat de les cèl·lules.^{25,26}

La família Mir-let7 té com a diana el mRNA de la proteïna *High-mobility group AT-hook 2* (HMGA2). HMGA2 pertany a la família de proteïnes HMGA que participen en la regulació de l'estructura de la cromatina, i actuen regulant l'expressió de proteïnes implicades en la morfologia i motilitat cel·lular.²⁷ Una sobreexpressió de Mir-let7 implicaria una inhibició d'aquesta regulació, i per això es veurien alterades aquestes dues característiques.

miR-22 inhibeix l'expressió de l' *Outer dense fiber protein 1* (ODF1). Es tracta d'una proteïna del citoesquelet que participa en la formació de l'axonema, essencial per la motilitat de l'espermatozoide.²⁷ La sobreexpressió de miR-22 actua impeding la correcta expressió d'ODF1, pel que es veu alterada la formació d'aquesta estructura, i consegüentment la morfologia i motilitat de la cèl·lula.

Respecte a la funció de miR-15b, inhibeix el mRNA d'*Isocitrate Dehydrogenase 3 (NAD(+)) Alpha* (IDH3A).²⁶ Es tracta d'un enzim implicat en el metabolisme cel·lular, concretament actua en el cicle dels àcids tricarboxílics. La inhibició de la seva funció implica una disminució en l'obtenció d'energia cel·lular, el que deriva en una alteració de la motilitat.

Els individus oligoastenozoospermics presenten diferències en la morfologia, motilitat, nombre de cèl·lules, i vitalitat, comparat amb els individus fèrtils. De nou, es coneix que alguns dels miRNAs alterats estan relacionats amb aquestes funcions cel·lulars. Mir-Let7, miR-30d, miR-132,

miR-192, i miR-335 es relacionen amb la morfologia; Mir-Let7, i miR-15 amb la motilitat; i miR-26a, miR-34c, i miR-449a amb el nombre de cèl·lules i la vitalitat d'aquestes.^{25,26}

L'expressió dels receptors d'estrògens està regulada per miR-26a. Es coneix en ratolins que els estrògens actuen inhibint l'apoptosi dels espermatozoides i són un estímul per la supervivència de la cèl·lula.²⁸ Una sobreexpressió de miR-26 inhibeix l'expressió dels receptors, això implica que els espermatozoides rebran un menor estímul de supervivència, i a conseqüència disminueix la vitalitat cel·lular.

Pel que fa al miR-449 es relaciona amb la regulació de la Caspasa-2 i *Bcl2*.²⁵ La Caspasa-2 actua induint el procés d'apoptosi. Davant una pèrdua de miR-449 hi haurà una sobreexpressió d'aquesta proteïna, i augmentarà el nombre de cèl·lules apoptòtiques.

Relacionat amb *Bcl2*, es produirà una sobreexpressió d'aquesta proteïna, i això implica que es perd el control en la regulació del nombre de cèl·lules apoptòtiques. Tal com s'ha explicat anteriorment, això és important per mantenir una bona interacció entre les cèl·lules de Sertoli i els gàmetes. A causa d'aquesta interacció indeguda per la pèrdua de miR-449 hi ha una diferenciació i formació errònia, disminuint el nombre de cèl·lules sexuals madures.

Comparant els perfils d'expressió dels dos grups de pacients infèrtils s'observa que aquests no són idèntics però si presenten la desregulació de miRNAs en comú (Taula 3).²⁵ Alguns dels miRNAs que comparteixen estan relacionats amb els caràcters que es troben alterats en aquests pacients. Per exemple, tots dos grups presenten una reducció de la motilitat espermàtica que podria estar causada, entre altres factors, per la desregulació de Mir-Let7 i/o miR-15b.

miRNAs expressats en individus astenozoospermics i oligoastenozoospermics		
Up regulats		Down regulats
hsa-let-7d	hsa-miR-29b	hsa-miR-122
hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-29c	hsa-miR-127-3p
hsa-miR-141	hsa-miR-30d	hsa-miR-1973
hsa-miR-148a	hsa-miR-30e	hsa-miR-3154
hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-320e	hsa-miR-34b
hsa-miR-193b	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-3679-5p
hsa-miR-200a	hsa-miR-361-5p	hsa-miR-4298
hsa-miR-200b	hsa-miR-363	hsa-miR-15b
hsa-miR-23b	hsa-miR-374a	
hsa-miR-24	hsa-miR-374b	
hsa-miR-26a	hsa-miR-429	
hsa-miR-27b	hsa-miR-520b	
hsa-miR-29a	hsa-miR-99a	
hsa-miR-98	hsa-miR-15b	

Taula 3. miRNAs expressats en els pacients astenozoospermics i oligoastenozoospermics.

En relació als miRNAs que actuen durant la regulació de les diferents etapes de l'espermatogenesis s'observa que es troben alterats als dos grups de pacients. Hi ha una sobreexpressió de MirLet-7, miR-146, miR-17-92, i una disminució en l'expressió de miR-122, i miR-34c.²⁵ Recordant la funció d'aquests miRNAs, es troben implicats en els processos de diferenciació i regulació de l'apoptosi cel·lular. No s'observa una expressió específica per a un tipus determinat d'infertilitat, pel que es pot deduir que la seva alteració donarà lloc a un error

en la formació dels gàmetes però no defineix les característiques específiques de cada grup de pacients.

Conclusió

Mitjançant l'elaboració del treball s'han assolit, pràcticament en la seva totalitat, cadascun dels objectius inicials.

Tal com s'ha descrit, les molècules de miRNA presenten una funció reguladora quant al control de l'expressió gènica. A més a més, la seva expressió presenta una regulació espaciotemporal, de manera que s'observen canvis en el patró de miRNAs en funció de l'estadi cel·lular. Això és important per determinar les característiques de cada tipus cel·lular, i per regular els processos de diferenciació i apoptosi, entre d'altres. Són molècules imprescindibles per aconseguir una correcta formació dels gàmetes madurs.

Respecte a la infertilitat masculina s'ha comprovat que una alteració a nivell de l'expressió dels miRNAs podria ser una de les múltiples causes d'aquesta malaltia. Analitzant les dades descrites a la literatura s'ha vist com pacients infèrtils amb diferents tipus d'alteracions en el seminograma presenten diferents nivells d'expressió dels miRNAs. És difícil, però, establir un patró d'expressió estàndard per cada grup de pacients, ja que s'observen diferències interindividuais i entre poblacions que dificulten aquesta classificació.

Es disposa però, a la literatura publicada, de diversos estudis que mostren el patró complet dels miRNAs expressats en pacients de poblacions definides. Concretament, analitzant el patró d'expressió dels miRNAs d' individus astenozoospermics i oligoastenozoospermics, i les diferències que presenten en comparació amb els individus fèrtils, i entre ells, s'observa que l'expressió de la majoria de miRNAs implicats en el procés d'espermatogènesi es troba alterada per igual en els dos grups, de manera que no es pot relacionar de forma específica amb les característiques de cadascun.

D'aquesta observació es dedueix que l'alteració dels miRNAs implicats en l'espermatogènesi dona lloc a alteracions en els processos de supervivència i diferenciació cel·lular, però les característiques específiques de cada grup, com alteracions en la morfologia o motilitat cel·lular, vénen definides per l'expressió d'altres miRNAs específics expressats als espermatozoides, que es troben regulant els gens responsables de l'aparició d'aquell fenotip.

És important per a un futur aprofundir els nostres coneixements en aquest àmbit molecular, ja que ens permetrà establir nous mètodes de diagnòstic, i tractament. Establint perfils de miRNA específics podríem definir noves classes d'infertilitat que no es poden detectar amb els mètodes actuals, i millorar les eines de diagnòstic.

Per altra banda, conèixer els miRNAs que s'alteren, i quines són les seves molècules diana, permetrà el desenvolupament de noves teràpies per tractar la infertilitat.

Bibliografia

1. Christopher J. De Jonge and Christopher L.R. Barratt. The Sperm cell: production, maturation, fertilization, regeneration. 1era edició. Cambridge, UK; 2006.
2. Kotaja N. MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertil Steril*. Elsevier Inc.;2014;101(6):1552-62.
3. Gou L-T. et al. Small noncoding RNAs and male infertility. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2014;5(6):733-45.
4. He Z. et al. Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction*. 2009;137(6):901-11.
5. Chen X. et al. The roles of microRNAs in regulation of mammalian spermatogenesis. *J Anim Sci Biotechnol. Journal of Animal Science and Biotechnology*; 2017;8(1):35.
6. Hamatani T. Human spermatozoal RNAs. *Fertil Steril*. Elsevier Inc.; 2012;97(2):275-81.
7. Kovac JR. et al. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertil Steril*. Elsevier Inc.; 2013;99(4):998-1007.
8. Niu Z. et al. MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(31):12740-5.
9. Yang Q-E. et al. MicroRNAs 221 and 222 regulate the undifferentiated state in mammalian male germ cells. *Development*. 2013;140(2):280-90.
10. Tong M-H. et al. Two miRNA Clusters, Mir-17-92 (Mirc1) and Mir-106b-25 (Mirc3), Are Involved in the Regulation of Spermatogonial Differentiation in Mice1. *Biol Reprod*. 2012;86(3):1-10.
11. G. Print, C. et al. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays*. 2000; 22(5): 423-430.
12. Huszar JM. et al. MicroRNA 146 (Mir146) Modulates Spermatogonial Differentiation by Retinoic Acid in Mice1. *Biol Reprod*. 2013;88(1):15
13. Tong M-H. et al. Expression of Mirlet7 Family MicroRNAs in Response to Retinoic Acid-Induced Spermatogonial Differentiation in Mice1. *Biol Reprod*. 2011;85(1):189-97.
14. Bouhallier F. et al. Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. *RNA*. 2010;16(4):720-31.
15. Yu M. et al. Mir-34c enhances mouse spermatogonial stem cells differentiation by targeting Nanos2. *J Cell Biochem*. 2014;115(2):232-42.
16. Liang, X. et al. MicroRNA-34c Enhances Murine Male Germ Cell Apoptosis through Targeting ATF1. *PLoS ONE*; 2012; 7(3):e33861.
17. Yu Z. et al. MicroRNA Mirn122a Reduces Expression of the Posttranscriptionally Regulated Germ Cell Transition Protein 2 (Tnp2) Messenger RNA (mRNA) by mRNA Cleavage1. *Biol Reprod*. 2005;73(3):427-33.
18. Dai L. et al. Testis-specific miRNA-469 up-regulated in gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25)-null mice silences transition protein 2 and protamine 2 messages at sites within coding region: Implications of its role in germ cell development. *J Biol Chem*. 2011;286(52):44306-18.
19. "Glosario de terminología en Técnicas de Reproducción Asistida (TRA)", Organización Mundial de la Salud, 2010. Disponible a: http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/art_terminology_es.pdf?ua=1

20. Sociedad Española de Fertilidad. Fertilidad y Reproducción Asistida, Disponible a: http://www.sefertilidad.net/docs/pacientes/spr_sef_fertilidad.pdf
21. "WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen", Sena edició, Organització Mundial de la Salut 2010. Disponible a: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44261/1/9789241547789_eng.pdf?ua=1
22. Wang C. et al. Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. Clin Chem. 2011;57(12):1722-31.
23. Lian J. et al. Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. Reprod Biol Endocrinol. 2009; (7):1-10.
24. Wu W. et al. Genome-wide microRNA expression profiling in idiopathic non-obstructive azoospermia: significant up-regulation of miR-141, miR-429 and miR-7-1-3p. Hum Reprod. 2013;28(7):1827-36.
25. Abu-Halima M. et al. Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. Fertil Steril. 2013;99(5):1249-1255.
26. Salas-Huetos A. et al. Spermatozoa from patients with seminal alterations exhibit a differential micro-ribonucleic acid profile. Fertil Steril. 2015;104(3):591-601.
27. Curry E. et al. Differential expression of porcine sperm microRNAs and their association with sperm morphology and motility. Theriogenology. 2011; 76(8):1532-1539.
28. Pentikainen, V. Estradiol Acts as a Germ Cell Survival Factor in the Human Testis in Vitro. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2000; 85(5):2057-2067.